

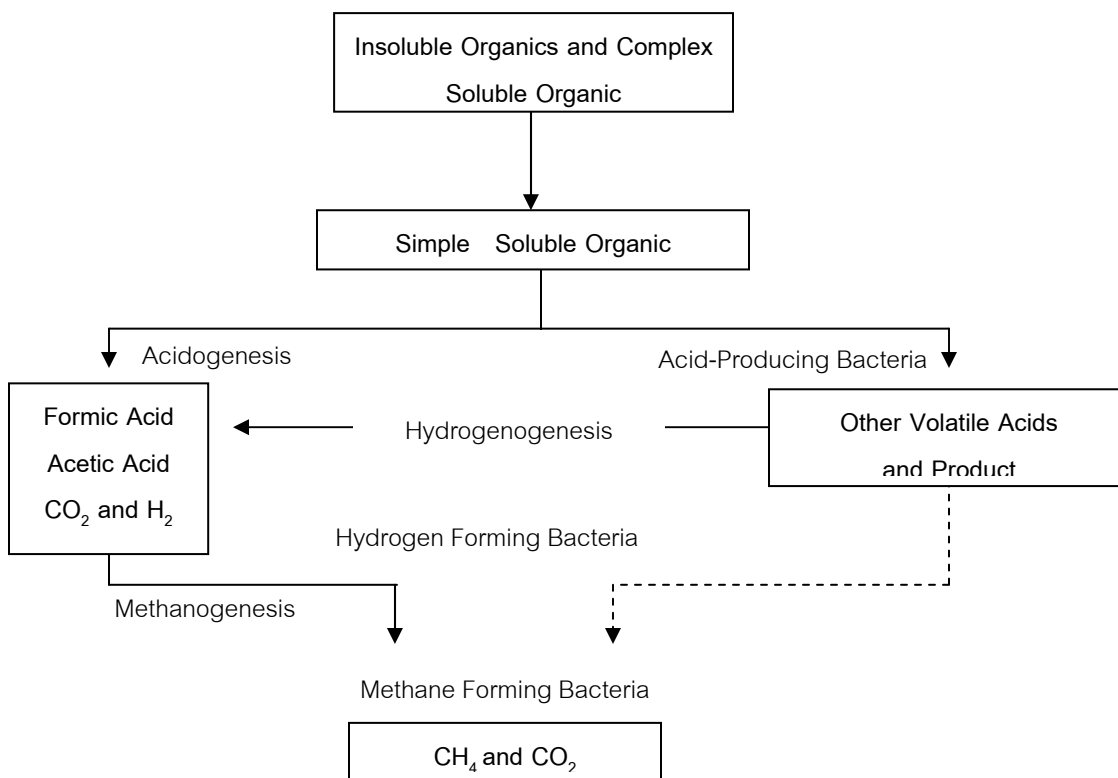
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความหมายของ ก๊าซชีวภาพและกระบวนการเกิดก๊าซชีวภาพ

2.1.1 ก๊าซชีวภาพ

คือก๊าซที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากการย่อยสลายสารอินทรีย์หรือในที่นี้หมายถึงมูลสัตว์ โดยจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน ก๊าซชีวภาพประกอบด้วยก๊าซหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามโดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นก๊าซมีเทน (CH_4) 50 - 70% และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 30 - 50% ส่วนที่เหลือเป็นก๊าซอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) และไอน้ำ ขั้นตอนการเกิดก๊าซชีวภาพ ซึ่งรวมทั้งสิ้น 4 ขั้นตอน (นิสากร, 2538) ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้อากาศ

ที่มา: ชีระ (2533)

2.1.2 หลักการกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยไม่ใช้ออกซิเจน

สารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำเสียจะถูกย่อยสลายภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนอิสระ โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobes) การย่อยสลายนี้อาจแบ่งได้เป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. Hydrolysis
2. Acidogenesis
3. Acetogenesis
4. Methanogenesis

- ขั้นตอน Hydrolysis

กระบวนการนี้เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า กระบวนการแตกสลายของสารโมเลกุลใหญ่ (Polymer breakdown) ในขั้นนี้สารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนทั้งที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน จะถูกทำให้ละลายน้ำด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส ซึ่งใช้เอนไซม์ที่จับออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ของจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ให้อยู่ในรูปที่จุลินทรีย์สามารถดูดซึมเข้าไปในเซลล์ได้ ผลของปฏิกิริยาจะได้สารประกอบอินทรีย์อย่างง่ายที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนและละลายน้ำได้ เช่น กลูโคส กรดอะมิโน กรดไขมัน เป็นต้น ซึ่งในการย่อยสลายขั้นตอนนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และการสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับสารอินทรีย์ เป็นต้น ดังนั้นการย่อยสลายสารอินทรีย์แต่ละชนิดจึงใช้เวลาต่างกันและผลิตภัณฑ์ที่ได้ขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นที่ถูกย่อยสลาย (ชาญศักดิ์, 2546)

เมื่อโมเลกุลสารอินทรีย์สามารถซึมผ่านผนังเซลล์จุลินทรีย์เข้าไปได้ จุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรด (Acidogens) จะใช้สารอินทรีย์เหล่านี้เป็นอาหารและปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดน้ำส้ม กรดอินทรีย์ที่ผลิตได้จะถูกนำไปใช้โดยกลุ่มจุลินทรีย์สร้างมีเทนได้ผลิตภัณฑ์คือก๊าซมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเรียกว่าก๊าซชีวภาพ (Biogas) ทั้งกลุ่มจุลินทรีย์สร้างกรดและสร้างมีเทนจะพบอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดินในแปลงนาข้าว ท่อระบายน้ำเสีย คูคลองที่เน่าเสีย และในมูลสัตว์ต่างๆ (กรมพลังงานทดแทนและอนุรักษ์ คืบจาก : <http://www.dede.go.th/dede/index.php?id=251,2549>) ทั้งนี้เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ จุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์ จุลินทรีย์สร้างกรดและจุลินทรีย์สร้างก๊าซมีเทนต้องอยู่ในสภาพสมดุลกัน หากอาหาร (มูลสัตว์) มีมากเกินไปจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 จะผลิตกรดขึ้นมามากจนกระทั่งจุลินทรีย์กลุ่มที่ 3 หยุดทำงาน หากอาหารมีน้อยเกินไปจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตช้า หากมีการกวนอาหารพอสมควร จะทำให้จุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่มทำงานสัมพันธ์

กันได้ หากมีการกวนอาหารมากเกินไปก็กลับจะทำให้การเกิดก๊าซลดลง เพราะไม่มีเวลาย่อยสลาย (นิศากร, 2538)

- ขั้นตอน Acidogenesis

สารประกอบอย่างง่ายที่ละลายน้ำที่สร้างขึ้นโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะถูกจุลินทรีย์ประเภทที่ดำรงชีพได้ทั้งสภาพมีและไม่มีออกซิเจนอิสระ (Facultative Anaerobic Bacteria) ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานโดยกระบวนการหมัก (Fermentation) ผลของปฏิกิริยาจะได้กรดระเหยง่ายที่มีคาร์บอนไม่เกิน 5 ตัว เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทีริก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จุลินทรีย์กลุ่มนี้เรียกว่า จุลินทรีย์สร้างกรดซึ่งสายพันธุ์ของจุลินทรีย์จะแตกต่างกันตามชนิดของสารอินทรีย์และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การเกิดกรดไขมันระเหยทำให้ค่าพีเอชของระบบลดลงซึ่งโดยทั่วไปค่าพีเอชของระบบที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการย่อยแบบไร้อากาศอยู่ในช่วง 6.5 - 8.0 (มันสิน, 2523) กรดไขมันระเหยที่ผลิตโดยแบคทีเรียสร้างกรดปกติควรมีค่าประมาณ 200 – 400 มก. ของกรดอะซิติก/ลิตร กรดไขมันระเหยที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจะเป็นสัญญาณว่าระบบกำลังเสียสมดุล เพราะทำให้พีเอชลดลงจนไม่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่อยู่ในระบบ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียสร้างมีเทนหรือแบคทีเรียสร้างกรด แม้ว่าแบคทีเรียสร้างกรดจะทนต่อกรดที่ผลิตขึ้นได้มากกว่าแบคทีเรียสร้างมีเทนก็ตาม

- ขั้นตอน Acetogenesis

กรดไขมันระเหยที่สร้างขึ้นจากขั้นตอนการสร้างกรด จะถูกเปลี่ยนโดยจุลินทรีย์สร้างกรดอะซิติก ให้เป็นอะซิเตท ฟอร์เมท ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญในการสร้างมีเทน (ภัทรารุช, 2546) ปฏิกิริยานี้ถือเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการหลีกเลี่ยงการสะสมของกรดไขมันระเหยและไฮโดรเจนที่มีปริมาณสูงจนสามารถยับยั้งการสร้างมีเทนได้ จุลินทรีย์กลุ่มนี้เรียกว่า จุลินทรีย์สร้างไฮโดรเจน

- ขั้นตอน Methanogenesis

ขั้นตอนนี้จุลินทรีย์จะย่อยสลายกรดอินทรีย์ คาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนเป็นก๊าซชีวภาพ โดยจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทน จะสามารถดำรงชีพอยู่ได้ภายใต้สภาวะไร้อากาศเท่านั้น จึงทำให้มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมได้น้อยกว่าจุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรด จุลินทรีย์กลุ่ม

สร้างมีเทนสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงพีเอช 7.0 – 7.8 และมีเวลาในการแบ่งตัวเท่ากับ 3-5 วัน (Busswell และ Mueller, 1952)

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของระบบบำบัดแบบไร้อากาศ

2.2.1 ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำเสีย

สารอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นอาหารของจุลินทรีย์ ดังนั้นความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำเสียจึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบ ในกรณีที่อัตราส่วนของอาหารต่อจุลินทรีย์สูง จำนวนจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีลักษณะกระจายอยู่ทั่วไปไม่รวมตัวกันเป็นกลุ่ม ทำให้ตกตะกอนได้ไม่ดี น้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วจะมีลักษณะขุ่นและมีสารอินทรีย์เหลืออยู่สูง แต่ถ้าอัตราส่วนของอาหารต่อจุลินทรีย์ต่ำ จุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้น้อยลง ดังนั้นการควบคุมการทำงานที่ดีจึงต้องควบคุมอัตราส่วนของอาหารต่อจุลินทรีย์ในระบบให้มีค่าเหมาะสม (Grady และ Lim, 1980)

2.2.2 ธาตุอาหาร

ธาตุอาหาร (Nutrient) ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และเหล็ก นอกเหนือไปจากสารอินทรีย์ต่างๆ ที่นำมาใช้เป็นพลังงาน โดยปกติแร่ธาตุเหล่านี้มีอยู่ครบในน้ำเสียชุมชนแต่อาจไม่เพียงพอในน้ำเสียอุตสาหกรรม การขาดธาตุอาหารที่สำคัญเหล่านี้จะทำให้จุลินทรีย์ที่สร้างฟล็อก (Floc) เจริญเติบโตได้ไม่ดี และทำให้จุลินทรีย์ชนิดที่เป็นเส้นใยเจริญได้มากกว่า ซึ่งจะทำให้สลัดจ์ (Sludge) ไม่จมตัวและอาจไหลปนออกมากับน้ำทิ้ง เนื่องจากระบบบำบัดแบบไร้อากาศต้องมีจุลินทรีย์ 2 ชนิดทำงานร่วมกันคือจุลินทรีย์สร้างกรดและสร้างมีเทน จุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรดไม่ค่อยมีปัญหา แต่จุลินทรีย์สร้างมีเทนมีลักษณะพิเศษและมีความต้องการแร่ธาตุบางอย่างในปริมาณน้อยมากแต่ขาดไม่ได้ แร่ธาตุดังกล่าวได้แก่ เหล็ก โคบอลต์ นิกเกิลและซัลเฟอร์ (ในรูปซัลไฟด์) (มันสิน, 2542) ดังนั้นถ้าในน้ำเสียขาดแร่ธาตุดังกล่าวปฏิกิริยาไร้ออกซิเจนจะไม่สามารถเกิดขึ้นได้หรือเท่ากับไม่สามารถเลี้ยงจุลินทรีย์ไร้ออกซิเจนนั่นเอง

2.2.3 ระยะเวลาในการบำบัด

ระยะเวลาในการบำบัดน้ำเสียต้องมีมากพอที่จุลินทรีย์จะใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ หากระยะเวลาไม่เพียงพอสารอินทรีย์บางส่วนโดยเฉพาะของแข็งที่ย่อยสลายได้ยากและถูกย่อยสลายได้ไม่หมด ทำให้มีค่าบีโอดีเหลืออยู่ในน้ำเสียมาก แต่ถ้านานเกินไปก็จะทำให้จุลินทรีย์ได้รับอาหารไม่เพียงพอและลดจำนวนลงได้ Miron และคณะ (2000) ศึกษาผลของเวลากักเก็บตะกอน (Sludge Retention Time) ในกระบวนการไฮโดรไลซิส กระบวนการสร้างกรด และกระบวนการสร้างมีเทน

ของน้ำเสียชุมชน โดยใช้ระบบกวนกวนสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 25°C แปรผันค่าเก็บกักตะกอนให้อยู่ในช่วง 3-15 วัน จากการทดลองพบว่าเมื่อระยะเวลาเก็บกักตะกอนน้อยกว่า 8 วัน ระบบจะอยู่ในสภาวะสร้างกรดในขณะที่มีการสร้างก๊าซมีเทนต่ำมาก ขณะเดียวกันเมื่อเวลาเก็บกักตะกอนมากกว่า 8 วันระบบจะทำงานในสภาวะสร้างก๊าซมีเทนได้ดี

2.2.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ค่า pH มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีที่ค่า pH ระหว่าง 6.5-8.5 ถ้าค่า pH สูงจะทำให้ฟอสฟอรัสตกตะกอนผลึกแยกออกจากน้ำ จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทำให้ระบบทำงานได้ไม่ดีเช่นกัน ค่า pH ไม่ใช่สัญญาณล่วงหน้าที่บ่งบอกถึงการทำงานที่ล้มเหลวของระบบไร้ออกซิเจนได้ทันทีทั้งนี้ความเสียหายจะเกิดขึ้นก่อนที่ pH จะลดลง ข้อมูล pH มีความสำคัญเนื่องจากจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่ม โดยเฉพาะกลุ่มสร้างมีเทนสามารถเจริญได้ดีในช่วง pH 8-9.2 เท่านั้น ถ้าไม่มีการควบคุมให้มีค่าเป็นกลางการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สร้างมีเทนก็จะถูกยับยั้งทำให้ระบบล้มเหลวได้ นอกจากนี้การรักษาค่า pH ให้เป็นกลางยังเป็นเรื่องจำเป็นอย่างยิ่งในระหว่างที่มีการแก้ไขระบบล้มเหลวให้ฟื้นตัว (มันสิน, 2542)

2.2.5 สารพิษ

สารพิษแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ พิษแบบเฉียบพลัน ซึ่งจุลินทรีย์จะตายหมดในระยะเวลาอันสั้น และพิษแบบออกฤทธิ์ช้า ใช้เวลานานและค่อยๆ ตาย พิษเฉียบพลันสามารถสังเกตดูได้ง่ายเนื่องจากมีผลเกิดขึ้นรวดเร็ว ตัวอย่างสารพิษได้แก่ ไซยาไนด์ สารหนู ส่วนสารพิษออกฤทธิ์ช้า เช่น ทองแดงและโลหะหนักต่างๆ จุลินทรีย์จะสะสมเอาไว้ภายในเซลล์จนเกิดเป็นพิษและตายในที่สุด (Grady และ Lim, 1980) นอกจากนี้ความเป็นพิษอาจเกิดจากสารอนินทรีย์ก็ได้ เช่น แอมโมเนียที่มีความเข้มข้นสูงเกิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (Gallert และคณะ, 1998) เป็นต้น

2.2.6 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญในการทำงานและเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นทุกๆ 10°C จะทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตขึ้นอีกเท่าตัวจนกระทั่งถึงอุณหภูมิประมาณ 37°C และอุณหภูมิที่สูงเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์เติบโตได้น้อยลง แต่ทั้งนี้การควบคุมอุณหภูมิขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาแบบไลโออาคามี 2 ช่วง คือ มีโซฟิลิก (Mesophilic) $30-38^{\circ}\text{C}$ และเทอร์โมฟิลิก (Thermophilic) $49-57^{\circ}\text{C}$ แต่โดยทั่วไปแล้วจะควบคุมอุณหภูมิในถังหมักให้อยู่ในช่วงมีโซฟิลิก เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการให้ความร้อนแก่ระบบนั้นสูงจึงไม่นิยม แต่อย่างไรก็ตาม

ตามการทำงานในช่วงอุณหภูมิสูงจะทำให้อัตราการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เวลากักเก็บ และขนาดของถังหมักลดลง

2.3 ความสำคัญของธาตุอาหารรอง

การพัฒนากระบวนการย่อยอาหารแบบไร้อากาศมักมุ่งเน้นที่เสถียรภาพของระบบ ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญก็คือ ความต้องการแร่ธาตุหรือธาตุอาหารรองของแบคทีเรียเพื่อใช้ในการกิจกรรมต่างๆ ธาตุอาหารรองมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สร้างมีเทนและกระบวนการสร้างมีเทน โดยเฉพาะแร่ธาตุหลักเป็นแร่ธาตุหลักที่เป็นองค์ประกอบเซลล์ ส่วนแร่ธาตุสังกะสี ทองแดง นิกเกิลและโคบอลต์ มีความสำคัญในช่วงการเจริญเติบโตตามลำดับ (Yansheng และคณะ, 2003)

แบคทีเรียสร้างมีเทนมีความต้องการแร่ธาตุเสริมหลายชนิดเพื่อการเจริญเติบโต ทั้งธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง บทบาทของแร่ธาตุเสริมหลักและแร่ธาตุเสริมรองที่มีต่อการเจริญโตและเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียไร้อากาศดังแสดงในตารางที่ 2.1 และ 2.2 เพื่อให้แบคทีเรียเกิดเมตาบอลิซึมอย่างเหมาะสมและกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศมีเสถียรภาพ ก็ควรมีแร่ธาตุเหล่านี้อยู่ในสัดส่วนและความเข้มข้นที่เหมาะสม (Kayhanian และ Rich, 1995)

ตารางที่ 2.1 บทบาทของธาตุอาหารหลักในกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ

แร่ธาตุ	บทบาท	หมายเหตุ
คาร์บอน	ให้พลังงาน สร้างเซลล์	เป็นแหล่งพลังงานหลักและธาตุที่สำคัญต่อการสร้างเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจากสารอินทรีย์โดยทั่วไปมักอุดมไปด้วยคาร์บอน คาร์บอนจึงไม่ใช่แร่ธาตุที่เป็นตัวจำกัด แต่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) คาร์บอนต่อฟอสฟอรัส (C/P) คาร์บอนต่อโพแทสเซียม (C/K) มักเป็นตัวจำกัดมากกว่า
ไนโตรเจน	สังเคราะห์โปรตีน	ไนโตรเจนเป็นสารอาหารเสริมที่มีความสำคัญต่อการสร้างเซลล์แบคทีเรีย ไนโตรเจนที่พบในเซลล์อยู่ในรูป Reduced-form เช่น อะมิโนไนโตรเจน ($R-NH_2$) ซึ่งมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์โปรตีน
ฟอสฟอรัส	สังเคราะห์กรดนิวคลีอิก	ฟอสฟอรัสมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์สารต่างๆ ของแบคทีเรีย แต่มักมีความสำคัญน้อยกว่าไนโตรเจนหรือคาร์บอน ฟอสฟอรัสมีความสำคัญในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก
โพแทสเซียม	ความสามารถในการซึมผ่านได้	โพแทสเซียมจะเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านได้ของเซลล์ ซึ่งจะช่วยให้การส่งผ่านแร่ธาตุเกิดได้ดีขึ้น และยังช่วยสร้างสมดุลประจุบวกในเซลล์อีกด้วย
ซัลเฟอร์	เอนไซม์หลายชนิด	ความต้องการซัลเฟอร์ของ Methanogens มีความซับซ้อนมาก เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวอาจใช้ซัลเฟอร์ได้ในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งเท่านั้นและมีหลายกระบวนการที่ทำให้ซัลเฟอร์หายไปจากระบบ กระบวนการสร้างมีเทนได้ ซัลเฟอร์อาจไม่อยู่ในรูปที่ถูกกรีตวซ์ คืออยู่ในรูปของซัลเฟต

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

แร่ธาตุ	บทบาท	หมายเหตุ
ต่อ		หรืออยู่ในสภาพที่ถูกรีดิวซ์ คือซัลไฟด์ ซัลเฟตอาจยับยั้งกระบวนการสร้างมีเทนได้ เนื่องจากแบคทีเรียไม่สามารถนำไปใช้ได้ ซัลเฟอร์ในรูปของซัลไฟด์มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสร้างมีเทนหลายชนิด เอนไซม์หลายชนิดต้องการซัลเฟอร์ เช่น Carbon monoxide dehydrogenase (CODH) และ Formate dehydrogenase (FDH) ซัลเฟอร์อาจหายไปอยู่ในรูปของไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) และอาจจะตกตะกอนอยู่ในรูปของโลหะซัลไฟด์ กิจกรรมของแบคทีเรียและอัตราการผลิตก๊าซชีวภาพก็อาจทำให้ซัลไฟด์ตกตะกอนได้

ที่มา : Kayhanian และ Rich (1995)

ตารางที่ 2.2 บทบาทของธาตุอาหารรองในกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ

แร่ธาตุ	บทบาท	หมายเหตุ
เหล็ก	CODH ¹ , ซัลไฟด์	เหล็กเป็นธาตุที่พบได้ในเนื้อเยื่อของแบคทีเรียสร้างมีเทนในปริมาณสูงกว่าโลหะหนักชนิดอื่นๆ เหล็กมีความจำเป็นหลายประการต่อกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ เช่น กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด และอาจตกตะกอนซัลไฟด์ รวมถึงช่วยจับ Extra cellular polymer ด้วย
โคบอลต์	CODH ¹	มักอยู่ในเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงและเอนไซม์ทั่วไป เช่น carbon monoxide dehydrogenase จะใช้โคบอลต์ในกิจกรรมการสร้างอะซิเตท

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

แร่ธาตุ	บทบาท	หมายเหตุ
โมลิบดีนัม	FDH^3 ยับยั้ง sulfur reducer	โมลิบดีนัมมักพบได้ในเอนไซม์ต่างๆไป เช่น Formate dehydrogenase (FDH^3) แต่โมลิบดีนัมอาจจะไปยับยั้ง sulfate reducing bacteria ทำให้การเกิดซัลไฟด์เป็นไปได้ยาก
ทองแดง	$\text{SODM, hydrogenase}^2$	ทองแดงเป็นส่วนประกอบของ super dismutase (SODH) และ hydrogenase อย่างไรก็ตามพบว่าการเติมทองแดงไม่ทำให้เกิดผลใดๆอย่างมีนัยสำคัญ
ซิลิเนียม	FDH^3 , เมตาบอลิซึมกรดไขมัน	ซิลิเนียมเป็นส่วนประกอบในเอนไซม์ของแบคทีเรียไร้อากาศ รวมถึงในกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรีย เอนไซม์ที่มีซิลิเนียมเป็นองค์ประกอบคือ FDH^3 ซิลิเนียมทำให้เอนไซม์มีความตื่นตัวที่พิเศษเป็นกลาง และมี Redox potential ต่ำ และอาจช่วยในการย่อยสลายไขมัน
ทังสเทน	FDH^3 และอาจช่วยในการเปลี่ยน CO_2 และ H_2 ไปเป็นมีเทน	ทังสเทนเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ FDH^3 และยังช่วยในการเมตาบอลิซึม CO_2 และ H_2 ในลักษณะเดียวกับนิกเกิล แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลการเติมทังสเทนอย่างแน่ชัด

CODH^1 = Carbon monoxide dehydrogenase

SODM^2 = Super dismutase

FDH^3 = Formate dehydrogenase

ที่มา : Kayhanian และ Rich (1995)

เนื่องจากกระบวนการบำบัดน้ำเสียเป็นวิธีคือ ระบบก๊าซชีวภาพ เป็นการทำงานของจุลินทรีย์ ซึ่งต้องการอาหารในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (Speece, 1996) ธาตุอาหารมีความจำเป็นต่อจุลินทรีย์ทุกชนิด กระบวนการผลิตก๊าซมีเทนเป็นผลผลิตของจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างมีเทน (Methanogens) ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ ซึ่งแต่ละชนิดก็มีความจำเพาะกับธาตุอาหารแตกต่างกัน จากการทดลองระดับห้องปฏิบัติการพบว่าน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ รวมทั้งน้ำเสียจากโรงงาน

อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่มและผลิตภัณฑ์อาหารหมักนั้นบางครั้งอาจมีธาตุอาหารแต่ละชนิดไม่เพียงพอหรือไม่เหมาะสมสำหรับกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ (Cho และคณะ, 1995) มีรายงานว่ากระบวนการย่อยแบบไร้ออกซิเจนขั้นตอนการเปลี่ยนสารประกอบอะซิเตทไปเป็นมีเทนนั้นเป็นขั้นตอนที่สำคัญ ในบางอุตสาหกรรมพบว่าอะซิเตทเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดมลพิษ ดังนั้นแร่ธาตุเสริมบางชนิดสามารถส่งเสริมการนำ อะซิเตทไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้นถึง 30 - 40 g/L ต่อวัน (Jensen และคณะ, 2006)

Speece (1996) รายงานว่ามีการทดลองนำแร่ธาตุที่มักขาดในระบบบำบัดแบบไร้อากาศที่สามารถหาได้ง่ายและราคาไม่แพง ประกอบด้วย สารประกอบของเหล็ก ทองแดง ซีลีเนียม โคบอลต์ แมงกานีส ทั้งสแตน นิกเกิล โมลิบดีนัม โบรอน และสังกะสี ทดลองแบบใช้สารเดี่ยวและใช้หลายสารร่วมกันเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมแร่ธาตุ) วัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นทุกวันและวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าทุกชุดการทดลองให้ปริมาณแก๊สแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และปริมาณกรดไขมันระเหย (Volatile Fatty Acid; VFA) ที่เกิดขึ้นสูงกว่าชุดควบคุม นอกจากแร่ธาตุที่กล่าวมาข้างต้นยังมีแร่ธาตุอีกหลายชนิดที่มีผลต่อกระบวนการผลิตมีเทน

นอกจากนี้ Mah และคณะ (1978) ทดลองเกี่ยวกับการใช้ธาตุเหล็ก นิกเกิลและโคบอลต์เพื่อเพิ่มอัตราการนำอะซิเตทไปใช้ พบว่าการใช้เหล็กหรือนิกเกิลเพียงอย่างเดียว สามารถเพิ่มการนำอะซิเตทไปใช้ได้ไม่เกิน $10 \text{ kg/m}^3\text{-d}$. แต่ถ้าใช้เหล็กและนิกเกิลร่วมกันได้ลงในถังปฏิกรณ์โดยตรงสามารถเพิ่มอัตราการนำอะซิเตทไปใช้ได้ถึง $30 \text{ kg/m}^3\text{-d}$. และในกรณีที่ใช้เหล็ก นิกเกิลและโคบอลต์ร่วมกันพบว่าเพิ่มอัตราการนำอะซิเตทไปใช้ได้มากกว่า $30 \text{ kg/m}^3\text{-d}$. ภายในเวลา 5 วัน

Kelly และ Switzenbaum (1984) ศึกษาพบว่าการใช้หางนมผง (Whey powder) เพียงอย่างเดียวมีอัตราการลดลงของ COD ประมาณ $6 \text{ kg/m}^3\text{-d}$ เมื่อใช้ร่วมกับเหล็ก นิกเกิลและโคบอลต์ อัตราการลดลงของ COD เพิ่มขึ้นเป็น $40 \text{ kg/m}^3\text{-d}$ ซึ่งการลดลงของ COD หรือ การใช้ COD มากขึ้น แสดงให้เห็นว่าในถังปฏิกรณ์มีปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดจากการเติมเหล็ก นิกเกิลและโคบอลต์ให้กับระบบ

ประโยชน์ของการเติมเหล็กในถังปฏิกรณ์ คือ การเพิ่มประสิทธิภาพของระบบและป้องกันไม่ให้ระบบล้มเหลว โดยเฉพาะถ้าสารตั้งต้นมีปริมาณของซัลเฟตสูง ซึ่งเหล็กเป็นธาตุอาหารที่ละลาย

น้ำได้น้อยและสามารถรวมกับซัลไฟด์ในระบบแยกตัวออกจากน้ำ ตกตะกอนผลึกในรูปของเหล็กซัลไฟด์ทำให้สามารถรักษาสมดุลของระบบได้ (Speece, 1996)

2.4 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตก๊าซมีเทน

ในกระบวนการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่ทำงานอย่างสัมพันธ์กัน เพื่อให้เกิดการย่อยสลายของสารอินทรีย์อย่างต่อเนื่องจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นก๊าซมีเทน โดยจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการย่อยสลายนี้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

2.4.1 จุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่สร้างมีเทน

จุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่สร้างมีเทนจะเป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรด โดยได้รับพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตจากการย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เป็นกรดอินทรีย์ระเหย (VFA) เช่น อะซิติก บิวทิริก โพรพิโอนิก นอกจากนี้ยังมีคาร์โบไฮเดรต ไฮโดรเจน แอมโมเนีย แอลกอฮอล์ และซัลไฟด์ จุลินทรีย์กลุ่มนี้เจริญเติบโตได้ดีในช่วง pH 4.0-6.5 และส่วนใหญ่เป็นพวกจุลินทรีย์กึ่งไร้อากาศ (Facultative Anaerobic Bacteria) ที่ดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้อากาศ ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี มีอัตราการเจริญเติบโตสูง โดยทั่วไปจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (Busswell และ Mueller, 1952)

2.4.2 จุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทน

จุลินทรีย์กลุ่มที่ทำให้เกิดก๊าซมีเทนซึ่งเจริญเติบโตได้ดีในช่วง pH 7.0 - 7.8 จุลินทรีย์กลุ่มนี้จัดอยู่ในพวกจุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาวะไร้อากาศเท่านั้น ดังนั้นจึงดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่จำกัดกว่ากลุ่มแรกและมีอัตราการเจริญเติบโตช้า ไม่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม โดยเฉลี่ยแล้วต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าประมาณ 3-5 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์สร้างมีเทนมักเป็นพวกที่ดำรงชีวิตโดยการใช้นิโตรเจน (Autotroph) เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน ในขณะที่จุลินทรีย์กลุ่มไม่สร้างมีเมเทนนั้นมักเป็นพวกที่ดำรงชีวิตโดยการใช้นิโตรเจน (Heterotroph) (Busswell และ Mueller, 1952)

2.5 การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างมีเทนและกลุ่มสร้างมีเทน

จุลินทรีย์กลุ่มไม่สร้างมีเทนนั้นมีความสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เป็นขนาดเล็กและอยู่ในสภาพที่จุลินทรีย์สร้างมีเทนสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตก๊าซมีเทนได้แล้วยังทำหน้าที่ในการปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทนอีกด้วย โดยเฉพาะพวกจุลินทรีย์สร้างกรดซึ่งเป็นตัวช่วยลดปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในระบบ เนื่องจากในกระบวนการผลิตกรดอินทรีย์จากสารโมเลกุลเล็ก จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะดึงออกซิเจนที่มีอยู่ในระบบไปใช้ด้วย ทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศในกระบวนการหมักมากขึ้น จึงเกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทนที่เป็นกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจน (Zeeman และคณะ, 1999)

2.6 ประโยชน์ของการใช้ธาตุอาหารเสริมรอง

Speece (1996) ทำการทดลองการใช้แร่ธาตุเสริมกับระบบบำบัดในถังปฏิกรณ์ระบบยูเอเอสบี (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) โดยจัดชุดการทดลองเป็น 3 ชุดคือ ชุดที่ 1 ชุดควบคุม ชุดที่ 2 เติมแคลเซียมและฟอสฟอรัส และชุดที่ 3 เติมเหล็ก นิกเกิลและโคบอลต์ ผลการทดลองพบว่า การเติมแคลเซียมและฟอสฟอรัสทำให้เกิดการรวมกันเป็นเม็ดตะกอนเพิ่มมากขึ้น ปริมาณตะกอนของสารอินทรีย์ (VSS) จากเริ่มต้น $70-100 \text{ kg/m}^3$ ลดลงเหลือ $1.5-3 \text{ kg/m}^3$ และอัตราการลดลงของ COD คงที่ที่ 90% ขึ้นไป ที่อัตราการเติมน้ำเสีย $10 \text{ kg/m}^3\text{-d}$ ส่วนผลการทดลองชุดที่ 3 พบว่าปริมาณของตะกอนสารอินทรีย์ไม่เปลี่ยนแปลงขณะที่อัตราการลดลงของ COD คงที่ที่ 95% ขึ้นไป ที่อัตราการเติมน้ำเสีย $10 \text{ kg/m}^3\text{-d}$ เช่นกัน จะเห็นว่าการเติมเหล็ก นิกเกิลและโคบอลต์ มีความเสถียรมากกว่า

การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารด้วยระบบไร้อากาศให้ผลดีและกรดอินทรีย์ระเหยมีความเข้มข้นต่ำ มีรายงานว่า การใช้โคบอลต์สามารถลดความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ระเหยจาก 3000 ml เป็น 500 ml ภายในเวลา 30 วัน ซึ่งปริมาณที่ใช้เพื่อให้ได้ผลดีคือ 0.0025 mg/L โคบอลต์ไม่มีผลต่อจุลินทรีย์ผลิตมีเทนจากอะซิเตทแต่มีผลมากสำหรับจุลินทรีย์ผลิตมีเทนจากเมทานอล เนื่องจากโคบอลต์ทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบของโคเอนไซม์ในกระบวนการผลิตมีเทนจากเมทานอลนั่นเอง ดังนั้นเป็นไปได้ว่าโคบอลต์ทำหน้าที่รักษาระดับของสารตั้งต้นระหว่างกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศของการผลิตมีเทน นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้โคบอลต์ร่วมกับนิกเกิล โมลิบดีนัม ซิลิเนียม และซัลเฟต สามารถเพิ่มอัตราการผลิตมีเทนได้ประมาณ 40% (Speece, 1996)

Jensen และคณะ (2006) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความจำเพาะของแร่ธาตุและกิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทน *Methanosacina barkeri* โดยใช้แร่ธาตุนิกเกิล โคบอลต์และความเข้มข้นของซัลไฟด์ พบว่ากิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทน มีมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแร่ธาตุโคบอลต์และนิกเกิลในช่วง 0-400 ไมโครมิลลิตรพร้อมกับการลดลงของซัลไฟด์ โดยความเข้มข้นของแร่ธาตุโคบอลต์ที่เพิ่มขึ้นส่งเสริมให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้มากขึ้นและไม่ส่งผลต่อความเข้มข้นของแร่ธาตุที่ละลายได้ในระบบให้เพิ่มขึ้น และจุลินทรีย์ใช้แร่ธาตุโคบอลต์มากกว่านิกเกิล อีกทั้งพบว่าแร่ธาตุทั้งสองชนิดมีผลต่อโครงสร้างเซลล์จุลินทรีย์มากกว่าความสมดุลของไอออนในระบบ โดยตารางที่ 2.3 แสดงปริมาณแร่ธาตุโคบอลต์และนิกเกิลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ *M. barkeri* ดังนี้

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของเซลล์ โคแฟกเตอร์และองค์ประกอบโดยประมาณของโคบอลต์และนิกเกิลใน *Methanosacina barkeri*

	Co	Ni
Cell cofactor content ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	0.28	0.043
Cofactor content/metal content (%)	90 $\pm$ 10	10 $\pm$ 5
Cell metal content ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	0.32 $\pm$ 10	0.6 $\pm$ 0.3
Metal consumption (nM)	190 $\pm$ 20	350 $\pm$ 170

ที่มา : คัดแปลงจาก Jensen และคณะ (2006)

นอกจากนี้พบว่ากิจกรรมของจุลินทรีย์สร้างมีเทนนั้นมีข้อจำกัด คือ แร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบถูกควบคุมโดยลักษณะเฉพาะของการใช้ของจุลินทรีย์ (Jewell, 1980)

Patidar และ Tare (2006) ศึกษาผลของสารอาหารที่มีต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ โดยเลือกใช้แร่ธาตุที่สำคัญ ได้แก่ เหล็ก นิกเกิล สังกะสี และโคบอลต์ โดยศึกษาทั้งการใช้แร่ธาตุเดี่ยวและใช้ร่วมกัน พบว่าการใช้แร่ธาตุร่วมกัน ได้แก่ แร่ธาตุเหล็ก-นิกเกิล-สังกะสี เหล็ก-นิกเกิล-โบลด์ เหล็ก-นิกเกิล-สังกะสี-โบลด์ ส่งเสริมให้กิจกรรมของจุลินทรีย์สร้างมีเทนลดปริมาณซัลไฟด์ได้มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่แร่ธาตุ

นิกเกิล-สังกะสี-ไบโอดซ์ เหล็ก-นิกเกิล-สังกะสี เหล็ก-ไบโอดซ์ และแร่สังกะสี สามารถกระตุ้นการทำงานของจุลินทรีย์สร้างมีเทนได้มากที่สุด

ในส่วนของการใช้แร่ธาตุของจุลินทรีย์พบว่าแร่ธาตุนิกเกิล โคบอลต์และสังกะสีเป็นแร่ธาตุที่ถูกใช้มากที่สุดตามลำดับ (Balch และคณะ, 1979)

นอกจากการใช้แร่ธาตุที่ทำงานร่วมกันแบบส่งเสริมกันแล้ว Patidar และ Tare (2006) ยังพบว่ามีแร่ธาตุบางชนิดที่ต่อต้านการทำงานของกันและกันด้วย เช่น แร่ธาตุนิกเกิลและสังกะสี ซึ่งพบว่าการใช้แร่ธาตุทั้งสองร่วมกันมีผลต่อจุลินทรีย์ในการลดปริมาณซัลไฟด์ได้น้อยกว่าการใช้แร่ธาตุนิกเกิลหรือสังกะสีเพียงชนิดเดียว ทั้งนี้เกิดจากนิกเกิลมีผลต่อการนำแร่สังกะสีไปใช้ของจุลินทรีย์สร้างมีเทนกลุ่มลดปริมาณซัลเฟต (Sulfate reducing bacteria) นั่นเอง

Karri และคณะ (2006) ศึกษาผลของทองแดง (Cu) ที่มีต่อปฏิกิริยาการใช้อะซิเตท (Acetoclastic) และการสร้างไฮโดรเจน (Hydrogenotrophic) ของจุลินทรีย์สร้างมีเทนและตัวลดซัลเฟตของตะกอน จุลินทรีย์ไร้อากาศ พบว่าคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถยับยั้งการสร้างไฮโดรเจนได้ถึง 27% และการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของคอปเปอร์ไอออนส่งผลให้จุลินทรีย์สร้างมีเทนและปฏิกิริยาการกำจัดซัลเฟตลดลงอย่างรวดเร็ว โดยคอปเปอร์ไอออนความเข้มข้น 63.5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์สร้างมีเทนได้อย่างสมบูรณ์ รวมทั้งระดับของปฏิกิริยา Hydrogenotrophic sulfate reducing ลดลงมากกว่า 99% ภายในเวลา 5 ชั่วโมง ดังนั้นปฏิกิริยาการกำจัดซัลเฟตของจุลินทรีย์สร้างมีเทนที่ทำหน้าที่กำจัด ซัลเฟตจะสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของคอปเปอร์ไอออนเริ่มต้นนั่นเอง